

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava radioaktivně značených
karcinogenů a toxikantů

Diplomová práce

Martina Hrebíčková

Školitel : doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Garant : doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2006

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc. a doc. RNDr. Marie Stiborové, CSc. na základě vlastních experimentů a s použitím citované literatury.

V Praze dne 1.6.2006



Martina Hřebíčková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat především svému trpělivému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., který mi byl vždy dobrým rádcem, vzorem a oporou. Dále děkuji osazenstvu laboratoře č.13 na katedře organické a jaderné chemie, a to především Ing. Šárce Pšondrové za velkou pomoc s praktickou stránkou věci. Velké díky bezesporu patří i Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za to, že mi pomohla v těžké situaci a dala mi novou příležitost, jakožto i za odbornou pomoc a rady.

Nakonec ještě díky všem nejmenovaným, kteří se podíleli na tvorbě této diplomové práce, ať už na pracovišti ÚVJ Řež značením vzorků, nebo u nás na katedře pomocnými měřeními.

Nechci opomenout ani předchozího školitele Doc.RNDr. Františka Nováka, CSc. a jeho ženu, čímž děkuji za jejich nesmírnou shovívavost během naší společné spolupráce.

Obsah

1	Úvod	5
1.1	Nádorová onemocnění.....	5
1.2	Mechanismus karcinogeneze	6
2	Obecná část	8
2.1	Biotransformace xenobiotik	8
2.1.1	Fáze biotransformace	9
2.2	Karcinogenně aktivní sloučeniny.....	10
2.2.1	Sanguinarin (SA)	10
2.2.2	Aristolochová kyselina I	11
2.3	Izotopově značené sloučeniny	12
2.3.1	Značená sloučenina	12
2.3.2	Možnosti značení látek radionuklidy	14
2.3.3	Tritiace.....	14
3	Cíl práce.....	17
4	Experimentální část	18
4.1	Použité chemikálie a přístroje	18
4.2	Experimenty	20
4.2.1	Sanguinarin	20
4.2.2	Aristolochová kyselina I	20
5	Výsledky a diskuse	23
5.1	Sanguinarin	23
5.2	Aristolochová kyselina I	26
6	Závěr.....	36
7	Seznam použité literatury	37
	Použité zkratky.....	40
	Přílohy	41

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí. Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, z nichž značně převažují - infekce, chronické záněty, patologické změny, špatná výživa nebo zátěž organismu působením xenobiotik i stresu. Možnost maligní přeměny je u každé tkáně, avšak frekvence této přeměny je u jednotlivých tkání velmi rozdílná. Každá tkáň má jiné histologické složení, různou intenzitu dělení buněk a metabolismu, odlišné regulační mechanismy, některé odlišné enzymové systémy nebo isoenzymy (např. u detoxikačních enzymů), a tím i různou schopnost aktivovat nebo vylučovat karcinogenní látky. Čím složitější organismus je, tím má větší škálu druhů konečně diferenciovaných buněk, a tím potřebuje více genů kódujících různé regulační proteiny^(1,2), čímž se zvyšuje riziko poškození.

1.1 Nádorová onemocnění

Souhrnný proces vzniku nádorů se nazývá karcinogeneze. Karcinogeneze je způsobena mutacemi genetického materiálu zdravých buněk, což vede k narušení regulačních procesů mezi buněčným dělením (proliferace) a programovanou buněčnou smrtí (apoptóza), což následně vede ke ztrátě schopnosti diferenciaci buněk, ke ztrátě tkáňové celistvosti a nekontrolovatelnému dělení buněk⁽³⁾. Následkem tohoto dělení vzniká nová tkáň, která se vyznačuje nadměrným autonomním růstem poškozujícím celý organismus. Taková tkáň se nazývá tumor nebo též neoplazma (novotvar⁽³⁾). Maligní nádory vzniklé z epiteliálních buněk jsou nazývány karcinomy, nádory vzniklé z podpůrných buněk nebo pojivových tkání jsou označovány jako sarkomy⁽⁴⁾.

1.2 Mechanismus karcinogeneze

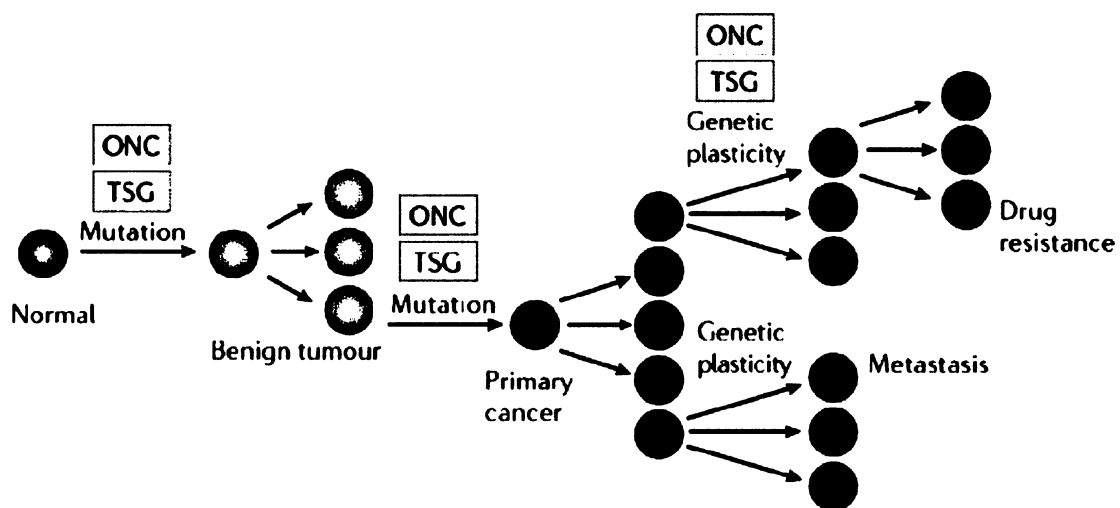
Podstatou bezchybného ontogenetického vývoje a diferenciaci buněk každého mnohobuněčného organismu je průběžná regulace exprese genů v buňkách, tedy regulace transkripce (přepis DNA do RNA), posttranskripčních úprav, translace (produkce proteinů dle informace obsažené v RNA) a posttranslačních úprav. Geny kodující proteiny, které se zapojují do této regulace (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory atd.) se nazývají protoonkogeny. Produkty těchto genů jsou pak označovány jako protoonkoproteiny⁽³⁾.

Vedle protoonkoproteinů se na regulaci buněčného cyklu podílí také tumor supresorové geny⁽³⁾, jejichž produkty působí jako přirozená brzda proliferace somatických buněk.

Zjednodušeně lze říci, že k maligní transformaci buňky dochází v důsledku změny (mutace) v protoonkogenech a tumor supresorových genech. Kromě přirozeně vznikajících chyb při replikaci může být DNA poškozena také působením vnějších faktorů. Mezi hlavní faktory zvětšující pravděpodobnost vzniku nádoru patří faktory fyzikální (jaderné, kosmické, UV a Roentgenovo záření nebo některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu), dále biologické vlivy (genetické předpoklady a některé viry – tzv. onkoviry^(5,6)) a také chemické karcinogeny.

Převážnou většinu modifikací DNA vznikajících přirozeně i v důsledku expozice organismu vnějším karcinogenním vlivům zvládá organismus prostřednictvím reparačních enzymových pochodů odstranit. Buňka, ve které došlo k mutaci DNA a toto poškození nebylo opraveno, je označována jako buňka iniciovaná. Pokud iniciovanou buňku nezlikviduje ani imunitní systém, setrvává v organismu do doby, než se v důsledku expozice faktorům s promočním účinkem⁽⁷⁾ (např. kouření, zvýšený příjem tuků) ještě více změní její genetická informace a dojde k růstu buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací - vzniká benigní nádor. To znamená, že růst buněk je ještě stále částečně kontrolovatelný. V okamžiku, kdy se růst stane nekontrolovatelným, vzniká nádor maligní, který infiltruje i do sousedních tkání a ničí je.

Buňky odštěpené z maligního nádoru se mohou dostat krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání nebo orgánů, kde se mohou usadit a vytvářet dceřinné nádory – metastázy.



Obr.1 Klasické schéma obecně uznávaného vzniku nádoru: Zdravá buňka – vznik první mutace – druhé mutace – třetí a další mutace až dojde ke vzniku zhoubných nádorových buněk.⁽⁸⁾

2 Obecná část

2.1 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky mající většinou toxické účinky na organismus. Metabolická přeměna xenobiotik vstupujících do organismu je do určité míry určena jejich rozpustností ve vodě či tucích. Látky lipofilního charakteru, které procházejí membránami a může tedy docházet k jejich kumulaci v organismu, nemohou být vyloučeny z těla přímo, ale musí být nejprve přeměněny na látky s vyšší polaritou⁽⁹⁾. Tyto hydrofilnější metabolity v závislosti na jejich chemické struktuře a na enzymovém systému, na něž působí, mohou být dvojího druhu:

- a) látky detoxikované – metabolit je oproti původnímu xenobiotiku již netoxický a biologicky inertní,
- b) látky aktivované – metabolity mohou mít i mnohem výraznější biotoxický účinek než původní sloučenina

Procesy detoxikační a aktivační nelze od sebe vzájemně oddělit neb mezi oběma směry metabolismu existují velice složité vztahy a rovnováhy, které mohou být v důsledku mnoha faktorů snadno vychýleny na tu či onu stranu⁽⁷⁾. Např. tentýž enzym může být angažován v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky jiné⁽¹⁰⁾.

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik ve dvou fázích⁽¹¹⁾. V první fázi, nazývané derivatizační dochází ke zvýšení polariry především redox a hydrolytickými reakcemi⁽¹²⁾. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami.

2.1.1 Fáze biotransformace

1) Derivatizační fáze

V této fázi většinou dochází ke zvýšení polarity xenobiotika zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly, nebo k demaskování funkčních skupin již přítomných⁽¹³⁾. Nejčastější cesta je oxidační (C-hydroxylace, N-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace apod.), některé reakce probíhají hydrolyticky (hydrolýza esterů, amidů), nebo redukčním mechanismem (redukce azo- a nitro- látek). Příkladem karcinogenů aktivovaných redukční cestou je 2-nitroanisol⁽¹⁴⁾, sanguinarin nebo kyselina aristolochová^(15,16,17).

2) Konjugační fáze

V druhé fázi biotransformace jsou na funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé hydrofilní molekuly (např. kyselina glukuronová, glycin, taurin, glutathion atd.)⁽¹²⁾. Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí.

2.2 Karcinogenně aktivní sloučeniny

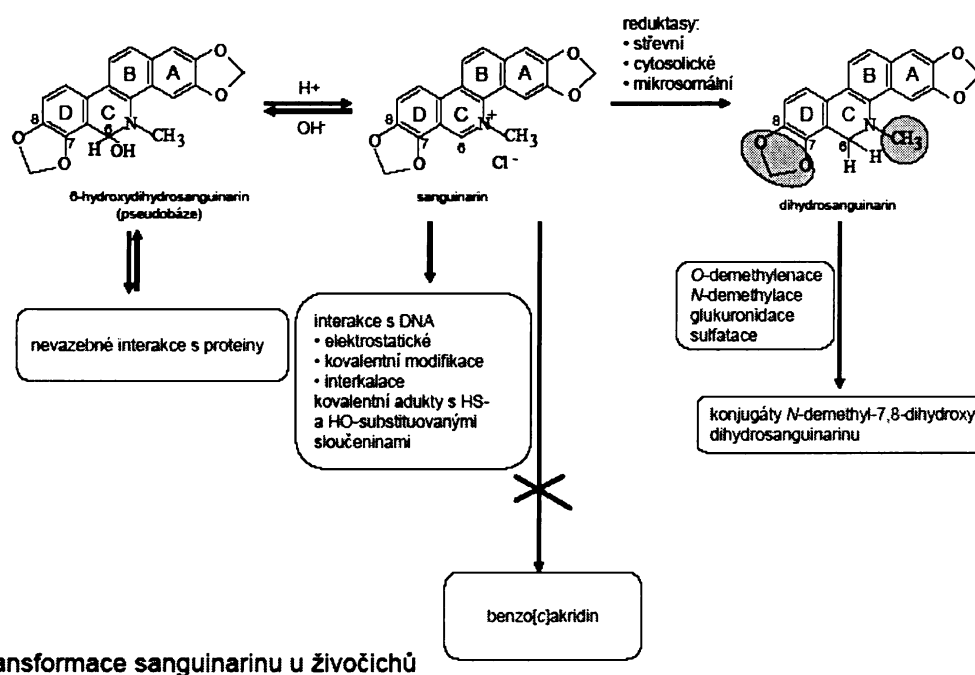
2.2.1 Sanguinarin (SA)

Sanguinarin patří mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (QBA), které jsou skupinou přírodních produktů. Nachází se v rostlinách čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae.

Hlavním zdrojem SA jsou *Sanguinaria canadensis* L. (Krevnice kanadská) a *Chelidonium majus* L. (Vlaštovičník větší), z nichž byl izolován ve formě kvartérních solí.

SA je řazen mezi fytoalexiny, sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy.

Má antimikrobiální a fungicidní aktivitu - jeho antimikrobiální účinky jsou využívány v ústní hygieně, a to především v zubních pastách, kde působí proti zánětům dásní inhibicí růstu orálních bakteri⁽¹⁸⁾. Je dokázán jeho ochranný vliv před rakovinou kůže tím, že zlepší výrobu bílkovin, které přivodí smrt buněk poškozených UV-B zářením, předpokládají se i protinádorové vlastnosti, díky schopnosti indukovat apoptózu⁽¹⁸⁾. V současné době se intenzivně zkoumá, zda a jaké tvoří interakce s DNA.



Obr. 2 Průběh transformace sanguinarinu v organismu živočichů. Převzato z ⁽¹⁸⁾.

2.2.2 Aristolochová kyselina I

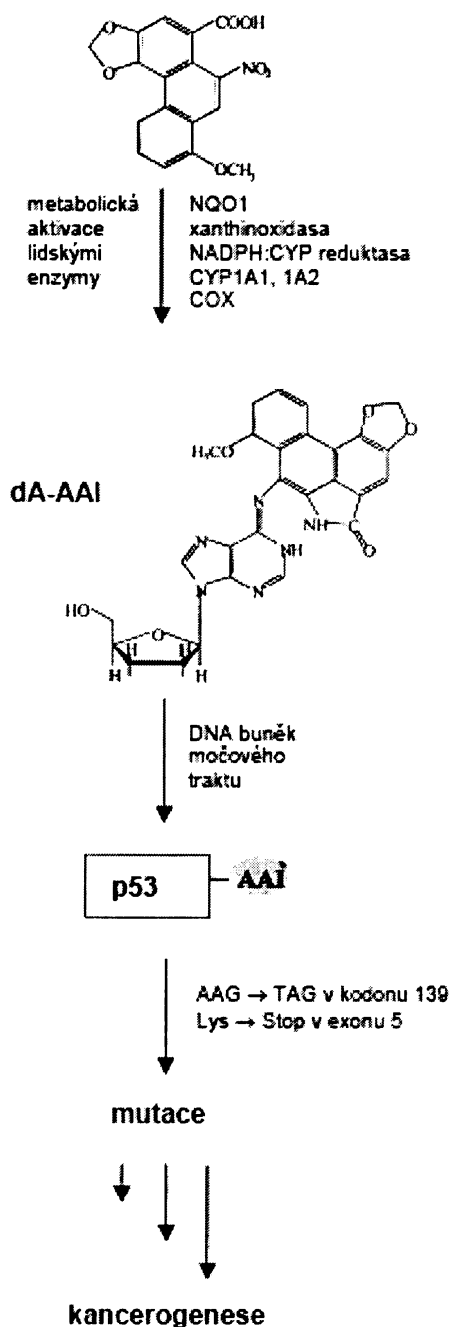
Kyselina aristolochová I patří mezi látky rostlinného původu nitrofenanthrenového typu. Nachází se v čínských bylinách (čeleď Aristolochiaceae), které jsou používány v lidovém léčitelství při redukci nadváhy. V pokusech na zvířatech AAI působí nefrotoxicky, karcinogenně a teratogenně. Otravy se projevují zvracením, průjmem, zánětem ledvin,

krvácením z dělohy a u těhotných může dojít k potratu. Smrt je po velkých dávkách způsobena zástavou dechu a srdce.

Je jednou z příčin balkánské endemické nefropatie a hlavním původcem nefropatie vyvolané čínskými bylinami^(19,20,21).

Nefropatie vyvolané čínskými bylinami je poměrně nový druh subakutní intersticiální nefropatie vyskytující se u žen, které používaly k zeštíhlující dietě tzv. Čínské byliny^(19,20,21).

Balkánská endemická nefropatie je choroba rozšířená v populaci žijící podél Dunaje. Charakteristické příznaky jsou anémie, ztráta tělesné hmotnosti, bolesti hlavy a progresivní zánět ledvin vedoucí k jejich úplnému selhání⁽²¹⁾. Majoritními metabolickými produkty aristolochových kyselin, tvořenými *in vitro* a *in vivo*, jsou aristolaktamy, jež byly detegovány v moči a výkalech savců včetně člověka. DNA adukt tvořený z acylnitreniového iontu generovaného z aristolochové kyseliny I s deoxyadenosinem je zodpovědný za iniciaci karcinogeneze vyvolané touto sloučeninou (Obr. 3).



Obr.3 Schéma iniciace nádorových procesů vyvolaných AAI v lidském organismu. Převzato z citace⁽²¹⁾.

2.3 Izotopově značené sloučeniny

Aplikace izotopově značených sloučenin v přírodních vědách jsou velmi rozsáhlé. Používají se např. ke studiu mechanismů a kinetiky chemických i biochemických reakcí, biogeneze rozličných látek rostlinného a živočišného původu, metabolických procesů, funkce jednotlivých živočišných orgánů atd. Velmi významnou úlohu hrají též v oblasti lékařské diagnostiky a terapie.

Tato diplomová práce se zabývala přípravou a využitím dvou značených toxikantů, sanguinarinu a aristolochové kyseliny I, využitelných pro studium jejich metabolismu v organismu.

2.3.1 Značená sloučenina

Pojmem značená sloučenina obvykle rozumíme takovou látku, která se od ostatních molekul ve vzorku liší jen málo svými vlastnostmi (fyzikálními, chemickými, biologickými), ale lze ji vhodnou analytickou metodou relativně snadno detekovat. Hlavní význam a přínos indikátorové metody⁽²²⁾ spočívá v možnosti rozlišit různé atomy stejného druhu. V některých aplikacích je možné indikátorovou metodu nahradit jinými postupy, ale rozlišení atomů stejného druhu, jak je tomu například při studiu mechanismu chemických reakcí, žádná jiná metoda neumožňuje. Metoda vyžaduje mít k dispozici indikátor ve shodné chemické formě jako je zkoumaná látka, aby byl splněn předpoklad stejného chemického chování.

Velký význam má použití indikátorů ve formě izotopicky modifikovaných molekul⁽²³⁾. Molekuly mohou být značeny jak stabilními, tak i radioaktivními izotopy⁽²³⁾ a pro obě metodiky jsou dostupné finální analytické postupy, ať už hmotnostní spektrometrie pro stabilní nuklidy, či měření radioaktivity pro nuklidy nestabilní. V biochemických aplikacích se používá obou variant.

Použití radioaktivních indikátorů je velmi rozšířené, mezi nejdůležitější oblasti patří studium rovnocennosti vazeb, důkazy existence nestálých sloučenin, průběh chemických reakcí, určování kinetických

parametrů chemických reakcí. Především se však metoda používá v biochemických, fyziologických a farmakologických experimentech. Radioaktivní indikátory jsou připravovány různými metodami radiochemické/organické syntézy a musí mít dostatečnou měrnou aktivitu, aby se měření dalo provést s dostatečnou přesností v přijatelném časovém intervalu.⁽²³⁾

Organické sloučeniny je vhodné označovat pouze izotopy těch prvků, ze kterých se sloučenina skládá. Náhrada některého z existujících atomů původní struktury odpovídajícím radionuklidem (^3H , ^{14}C , ^{35}S apod.) se nazývá interní značení. V některých případech je taková modifikace velmi obtížná nebo nemožná. Potom se používá takzvané externí značení, jako je třeba značení proteinů na tyrosinovém aromatickém jádře elektrofilní substitucí izotopem jodu, methylace dusíkového atomu přírodních látek ^{14}C nebo ^3H methyljodidem, nebo vnesení snadno jodovatelné struktury do základního skeletu (Bolton-Hunterovo činidlo) apod. Nevýhodou externího značení je modifikace molekuly, která může vést ke změnám nebo až ztratě testované biologické aktivity

Příprava a manipulace s radioaktivně značenými sloučeninami je poměrně složitá a přístroje pro vyhodnocení množství radioaktivity ve vzorku jsou nákladné. Všechny uvedené nevýhody však zastiňuje exklusivní citlivost metody použití radioaktivních markerů, která zvláště v biochemických a farmakologických experimentech dovoluje ve spojení s moderními molekulárně-biologickými metodami zkoumat biosystémy až na receptorové úrovni!

2.3.2 Možnosti značení látek radionuklidy

Ke značení se používají jak stabilní tak i radioaktivní nuklidy. Radioaktivní nuklidy mají proti stabilním především tu výhodu, že jejich detekce i stanovení koncentrace ve značených sloučeninách je relativně snadné. Mezi biogenními prvky snadno najdeme potřebnou škálu radionuklidů s vhodnými parametry jak co se týče poločasu rozpadu, tak i energie emitovaného záření. Nevýhodou je, že práce s nimi vyžaduje dodržování přísných bezpečnostních opatření a často i potřebu speciálně vybudovaných a vybavených laboratoří. Navíc sloučeniny značené radioaktivními nuklidy, kromě běžných chemicky rozkladných procesů, nelze libovolně dlouho skladovat, protože podléhají autoradiolýze⁽²⁴⁾.

Značení stabilními nuklidy je výhodné tím, že syntézu sloučenin i veškeré další operace s nimi lze provádět v normálních laboratořích. Dále je možné pracovat s větším množstvím látky a sloučeniny nepodléhají autoradiolýze. Hlavní nevýhodou je relativně náročné a přístrojově nákladné stanovení jejich koncentrace (převážně hmotnostním spektrometrem)⁽²⁴⁾ a v neposlední řadě i finanční náročnost zdrojů stabilních nuklidů.

2.3.3 Tritiace

Pro značení zmíněných sloučenin je nejjednodušší použití izotopu ^3H .

Tritium je poměrně levný radioizotop, s poločasem rozpadu 12,4 roku, což je vhodné pro většinu biochemických experimentů. Emituje β -záření s nízkou energií. Lze ho použít v plynné formě nebo jako $^3\text{H}_2\text{O}$ s isotopovým obohacením téměř 100 %. Principiálně se jedná o substituci či adici vodíku. Substituce je často možná s komplikovanými molekulami při zachování uhlíkové kostry.

Pro námi vybrané látky jsou nejvhodnější 2 metody značení tritiem:

A. Izotopová výměna: příprava ^3H -značených sloučenin izotopovou výměnou je obecně nejdůležitější metodou pro zavádění atomů tritia do molekul.

Tato metoda dovoluje značení i velmi složitých molekul, které jinak značeny být nemohou, a to dvojitým postupem

- a) Katalytická výměna v roztoku
- b) Výměna s plynným tritiem : prvně popsána v roce 1956 Wiltzbachem a následně také nazvána jako Wiltzbachovo značení⁽²⁵⁾: Metoda spočívá v ponechání sloučeniny v kontaktu s plynným tritiem po několik dnů nebo týdnů. Během této doby radiace vyvolá výměnné reakce mezi atomy vodíku sloučeniny a plynným tritiem. Výsledná sloučenina je poté obvykle čištěna chromatografickými metodami (HPLC, TLC, na iontoměničích atd.)

Jednoduchost metody vedla k mnoha snahám zlepšit efektivitu zabudování tritia a snížit množství vedlejších produktů při tritiačním procesu. Efektivita značení byla značně zlepšena metodou katalyzované výměny s plynným tritiem, kdy se sloučenina hydrogenuje plynným tritiem v roztoku za přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru (Pt nebo Pd). Užitím tohoto postupu se dá získat 2-3.000 x vyšší měrná aktivita než u metody bez použití katalyzátoru. Novější metody využívají např. organokovových komplexů iridia jako třeba bidentálních fosfinů $[(cod)Ir(dppe)]BF_4$ nebo $[(cod)Ir(py)(PCy_3)]BF_4$, kdy je v některých případech možná predikce polohy značení⁽²⁶⁾.

Reakce s plynným tritiem v přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru, kdy se v praxi obvykle používá Pd/C, je však analogií klasické hydrogenační reakce, která způsobí nejen izotopovou výměnu, ale atakuje redukovatelné části tritiované molekuly. Přítomnost redukovatelných funkčních skupin je proto limitujícím faktorem pro použití této metody. Není tak možné označit například molekuly obsahující nitroskupinu, alkoxykarbonylovou skupinu apod., protože získáváme odpovídající redukované funkční skupiny. V případě redukovaných nitrolátek je v některých případech možná zpětná oxidace na nitrosloučeninu, pokud je zbytek molekuly k oxidačnímu činidlu dostatečně inertní^(27,28,29).

Dalším problémem je přítomnost atomů halogenů v molekule. Kovalentně vázané halogeny mohou podlehnout snadno dehalogenaci, která degraduje původní strukturu.

Jako alternativní metodu vnášení atomů tritia do organické molekuly lze s výhodou použít:

B. Reduktivní dehalogenace

Reduktivní dehalogenace v uvažovaném smyslu je reakce, která umožňuje nahrazení halogenu v molekule substrátu atomem vodíku, deuteria resp. tritia.

Pro hydrodehalogenace arylhalogenů je k dispozici řada reakčních činidel. Jednoduchým procesem je například použití alkoxidového aniontu, kdy vodíkový atom na uhlíku vedle alkoxidového kyslíku přechází na molekulu jodatomátu za současného odštěpení halogenidového aniontu⁽³⁰⁾. Při použití alkylamidových aniontů (lithium diethylamid) probíhá dehalogenační reakce přes stadium benzynu⁽³¹⁾. Reduktivní dehalogenace tetrahydridohlitanem lithným (LiAlH_4) probíhá přes stadium organohlinitých sloučenin⁽³²⁾. Použitelný je rovněž tetrahydridoboritan sodný, který v systému acetonitril voda dechloruje 3- a 4-chlorobifenyl⁽³³⁾. Řada halogenovaných benzenů byla úspěšně redukována LiAlH_4 v tetrahydrofuranu za laboratorní teploty⁽³⁴⁾. Dobře prozkoumaným je systém $\text{NaBH}_4/\text{Cu}_2\text{Cl}_2$, který byl použit i pro deuteraci vybraných substrátů. Mechanismus reakce zahrnuje tvorbu nestálých hydridů mědi, které složí jako vlastní redukční činidlo⁽³⁵⁾. Moderní jsou metody katalytické dehalogenace v systému kov/imidazoliová sůl/báze. Použitý systém 2,4,6-trimethylfenylimidazolium chlorid/ $\text{Pd}(\text{dibenzylidenaceton})_2/\text{methoxid}$ draselný poskytly výborné výsledky při dehalogenaci p-chlortoluenu⁽³⁶⁾. Výrazný je zde vliv báze, která poskytuje potřebný vodíkový atom. Proto také klasické báze typu uhličitan cesný nebo sodný poskytovaly nulové výtěžky. Využití dalších palladiových komplexů za podmínek mikrovlnného ozáření přineslo další zlepšení efektivity reakce - prakticky 100 % výtěžky při reakční době 2 minuty⁽³⁷⁾. Vynikající výsledky byly rovněž dosaženy s acetylacetonátem niklu i bez mikrovlnného ataku⁽³⁸⁾. Hydrodehalogenaci lze samozřejmě provést i klasickým způsobem reakcí arylhalogenidu s plynným vodíkem za katalýzy Pd/C v přítomnosti báze. Výtěžek reakce lze ovlivnit modifikací báze nebo přidávkem kvartérní amoniové soli. Uvedenou reakci lze provést dokonce i ve dvoufázovém uspořádání voda/isooktan, kdy lze použít ve vodě rozpustné anorganické báze⁽³⁹⁾.

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce byla příprava, purifikace a stanovení základních parametrů tritiem značených dvou biochemicky účinných přírodních toxikantů, sanguinarinu a aristolochové kyseliny I.

A. K přípravě značeného sanguinarinu bylo nutné:

- a) vypracovat literární rešerši na téma tritiace organických sloučenin, redukční dehalogenace arylhalogenidů, interakce organokovových hydridů s běžnými redukovatelnými funkčními skupinami organických molekul
- b) provést tritiaci sanguinarinu, nalézt podmínky HPLC purifikace, provést čištění produktu a charakterizovat získanou značenou sloučeninu odpovídajícím protokolem

B. K přípravě značené aristolochové kyseliny I bylo nutné:

- a) na základě rešerše zvolit vhodný hydrid, který lze připravit snadno v tritiované formě a experimentálně ověřit možnosti jeho přípravy v neaktivní formě
- b) připraveným hydridem provést redukční dehalogenaci na modelovém systému p-jodacetanilid - acetanilid za různých podmínek a s použitím katalyzátorů.
- c) připravit tritiovaný hydrid a provést experiment na výše uvedeném modelovém systému
- d) provést jodaci aristolochové kyseliny I v mikrokvantu, ověřit inkorporaci jodu do molekuly
- e) provést dehalogenační reakci s připraveným tritiem a pokusit se izolovat tritiovaný analog aristolochové kyseliny I

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

Použité chemikálie tributylcínchlorid, tributylstannan, stejně jako suchý tetrahydrofuran byly pořízeny od firmy Sigma -Aldrich. Modelové látky p-jodacetanilid a acetanilid byly nezávisle připraveny v laboratoři školitele a přečištěny krystalizací z vody. Pd/C (10 %) bylo zakoupeno od firmy Fluka. Katalyzátory $[\text{NiCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$, $[\text{PtCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$, $[\text{RuCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_3]$, $[\text{RhCl}(\text{Ph}_3\text{P})_3]$, $[\text{CuCl}(\text{Ph}_3\text{P})_3]$ a $[\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$ byly získány od firmy Premion.

Methanol pro přípravu mobilní fáze byl od firmy Lab-Scan v kvalitě pro HPLC, dále byla pro přípravu mobilních fází použita deionizovaná voda (WATEK). Sanguinarin izolovaný z rostlinného materiálu byl připraven na spolupracujícím pracovišti LF UP v Olomouci (laboratoř. Prof. MUDr. et RNDr. V. Šimánka, Dr.Sc.). Aristolochová kyselina I byla připravena izolací z přírodní směsi aristolochových kyselin získané od firmy Macherey-Nagel (SRN) pomocí HPLC, a to na spolupracujícím pracovišti Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu.

Pro analýzy byl použit kapalinový chromatograf INGOS sestávající z vysokotlakého čerpadla LCP5020, UV detektoru LCD5000 a autosampleru LCS5040 a kapalinový chromatograf Shimadzu - čerpadlo LC20-AD, UV detektor SPD 20A, manuální nástřík 20 μl - Rheodyne.

Podmínky:

Metoda A: (sanguinarin) Kolona Supelcosil LC-18-DB, 4,6 x 250 mm, mobilní fáze acetonitril/50 mM octan sodný ve vodném roztoku kyseliny octové (40/60, v/v), průtok 1,5 ml/min, 26 °C, detekce UV 284 nm.

Metoda B: (p-jodacetanilid, acetanilid), Kolona o rozměrech 4x250 mm, sorbent Reprosil 100 (C-18), 5 μm , mobilní fáze methanol/voda (7:3, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Detekce UV 254 a 270 nm.

Metoda C: (aristolochová kyselina I) Kolona o rozměrech 4x250 mm, sorbent Reprosil 100 (C-18), 5 μm , mobilní fáze methanol/voda/kyselina octová (65:34:1, v/v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Detekce UV 250 nm.

Chromatogramy byly vyhodnoceny programem Clarity (DataApex). Dále byla k analýze reakčních směsí použita TLC (sorbent SiO₂, Macherey-Nagel), mobilní fáze hexan/chloroform (8:2)., detekce UV při $\lambda = 254$ nm, resp. hmotnostní spektrometrie (Bruker Esquire 3000, ESI; Shimadzu QP 2010 (GC-MS)).

Tenkvrstevná chromatografie (TLC) použitá k orientačním analýzám reakčních směsí a ověřování čistoty byla prováděna na komerčních deskách SiO₂-TLC/UV254 (Macherey-Nagel, SRN).

K vyhodnocení chromatogramů byla využívána UV-lampa (254 nm). Hmotnostní spektra k ověření identity produktů byla měřena servisním způsobem na přístrojích Bruker Esquire 3000 (ESI), resp. Shimadzu QP2010 (GC-MS).

Pro detekce tritia v radioaktivních experimentech byl použit kapalinový scintilační spektrometr Beckmann 6000 LS (scintilační roztok Rotiszint ecoplus, Roth) a HPLC detektor radioaktivity Flow scintillation analyzer 150TR s měřicí celou plněnou scintilačním sklem (Packard) připojený k výše uvedené HPLC sestavě. Autoradiogramy byly získány elektronickou autoradiografií na přístroji Instant Imager (Packard).

Příprava [³H]tributylstannanu byla provedena na spolupracujícím pracovišti ÚJV v Řeži podle dodaného návodu. K 100 μ l tributylcínchloridu ve 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 100 mg sušeného uhličitanu vápenatého, 5 mg 10 % Pd/C. Reakční směs byla míchána po dobu 24 hod při 50° C. Poté bylo odstraněno plynné tritium a reakční směs byla bez dalších úprav použita k dehydrohalogenačním reakcím. Celková aktivita reagentu byla 2,6 GBq v cca. 3 ml objemu.

Tritiace sanquinarinu byla provedena rovněž na ÚJV Řež. Sanquinarin (5,2 mg) byl rozpuštěn ve vodném methanolu (1:1, v/v; 5 ml), přidán katalyzátor (5% Pd/BaSO₄, 21,4 mg) a směs byla tritiována plynným tritiem za laboratorní teploty po dobu 90 min. Po ukončení reakce byla odstraněna labilní aktivita několikanásobným odpařením s methanolem. Odparek byl rozpuštěn v methanolu. Výsledný roztok o objemu 8,1 ml vykazoval aktivitu 264,7 MBq.

4.2 Experimenty

4.2.1 Sanguinarin

Reakční směs po tritiaci sanguinarinu byla předčištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (Merck 100, 8 x 150 mm). Jako mobilní fáze byl použit čistý methanol. Byly sbírány frakce po 4 minutách (8 kapek/min) a v jednotlivých frakcích byla stanovena aktivita LSC. Frakce 3 - 6 vykazující aktivitu byly spojeny a analyzovány HPLC (*Metoda A*). [³H]sanguinarin byl z předčištěného vzorku o objemu 2,5 ml izolován HPLC za výše uvedených podmínek postupným manuálním nástřikem vzorku po 25 μ l. Na základě kalibrační závislosti neaktivního preparátu byla stanovena koncentrace sanguinarinu v izolovaném preparátu, měrná aktivita byla stanovena podle LSC měření. Obvyklé parametry udávané pro značené sloučeniny jsou uvedeny v Příloze 1 - Protokolu o přípravě značené sloučeniny.

4.2.2 Aristolochová kyselina I

Reduktivní dehalogenace p-jodacetanilidu tributylstannanem:

K roztoku 3 mg (0,011 mmol) p-jodacetanilidu v 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 10 μ l (0,38 mmol) tributylstannanu. Reakční směs byla za nepřístupu vzduchu míchána magnetickým míchadlem. Reakce byla prováděna při teplotách 25°C a 50°C po dobu 4 hodin.

V půlhodinových intervalech byly odebírány vzorky (50 μ l), zpracovány přídatkem 300 μ l mobilní fáze a analyzovány HPLC (*Metoda B*).

Chromatogramy byly interpretovány vzhledem ke standardům p-jodacetanilidu resp. acetanilidu naměřených za stejných podmínek.

Reakce byla za stejných podmínek provedena s větším přebytkem tributylstannanu (100 μ l, 3,8 mmol) a dále v přítomnosti 0,5 mg katalyzátoru.

Jako katalyzátory byly použity látky:

10% Pd/C

komplex bis(trifenylfosfino)dichloropalladnatý – [PdCl₂(Ph₃P)₂]

komplex tris(trifenylfosfin)chloroměďnatý - [CuCl(Ph₃P)₃]

komplex tris(trifenylfosfin)chlororhodný - [RhCl(Ph₃P)₃]

komplex tris(trifenylfosfin)dichlororuthenatý - [RuCl₂(Ph₃P)₃]

komplex bis(trifenylfosfin)dichloroplatnatý - [PtCl₂(Ph₃P)₂]

komplex bis(trifenylfosfin)dichloronikelnatý - [NiCl₂(Ph₃P)₂]

Příprava tributylstannanu z chlorotributylstannanu:

K 100 µl chlorotributylstannanu ve 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 100 mg sušeného uhličitanu vápenatého, 5 mg 10 % Pd/C. Reakční směs byla míchána po dobu 4 h. Reakce byla provedena při laboratorní teplotě a při 50° C. Vznik tributylstannanu byl detegován reakcí s p-jodacetanilidem za podmínek reduktivní dehalogenace.

Modelová redukce [³H]tributylstannanem:

K roztoku 1 mg (0,004 mmol) p-jodacetanilidu v 1 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 0,5 mg [CuCl(Ph₃P)₃] a 200 µl směsi připravené tritiací chlorotributylstannanu za katalýzy Pd/C (viz materiály a metody). Reakční směs byla za nepřístupu vzduchu míchána magnetickým míchadlem. Reakce probíhala při teplotě 50°C po dobu 4 hodin. Po uplynutí reakční doby byl odebrán vzorek (100 µl, který byl zpracován přidavkem 200 µl mobilní fáze a centrifugován). Supernatant byl analyzován HPLC s detekcí UV a detekcí radioaktivity.

Jodace aristolochové kyseliny I:

Vzhledem k nepatrným množstvím dostupného substrátu byla pro jodaci použita chloraminová metoda. Ke 0,5 mg aristolochové kyseliny I v 1 ml fosfátového pufru (0,25 mol/l, pH 7,5), přidán 1 ml roztoku NaI v destilované vodě (1 mg/ml) a 1 ml roztoku chloraminu T v destilované vodě (0,5 mg/ml). Směs byla za občasného promíchání ponechána reagovat 30 min. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 ml 1 % roztoku siřičitanu sodného. Směs byla okyselena roztokem HCl na pH = 3-4 a extrahována

chloroformem (3 x 3 ml). Chloroformový extrakt byl přes noc sušen síranem sodným, sušidlo bylo odděleno a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 2,4 mg jasně žluté pevné látky, která byla bez dalšího čištění použita k hydrodehalogenační reakci.

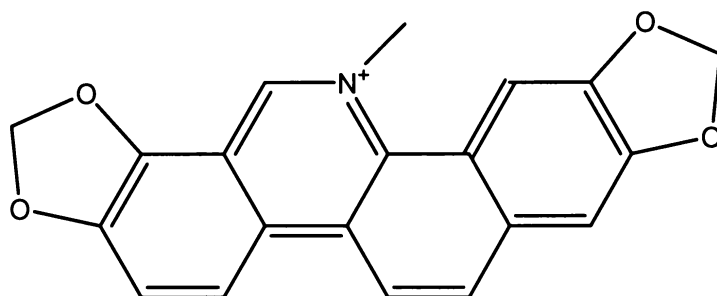
Stopovací experiment jodace aristolochové kyseliny I s přídavkem Na¹³¹I:
Jodace byla provedena stejným postupem pouze v desetinných navážkách vzhledem k původnímu předpisu. Před přidáním chloraminu byl do reakční směsi přidán roztok Na¹³¹I (cca. 500 kBq). Chloroformový extrakt byl analyzován TLC a elektronickou autoradiografií.

Hydrodehalogenace kyseliny jodaristolochové připraveným tributylstannanem a [³H]tributylstannanem byla provedena za stejných podmínek jako výše uvedená modelová redukce tritiováním hydridem.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Sanguinarin

Pro tritiaci sanguinarinu byla zvolena obvyklá metoda katalytické izotopové výměny s plynným tritiem. Struktura sanguinarinu (viz .Obr 4)



Obr.4 Struktura sanguinarinu

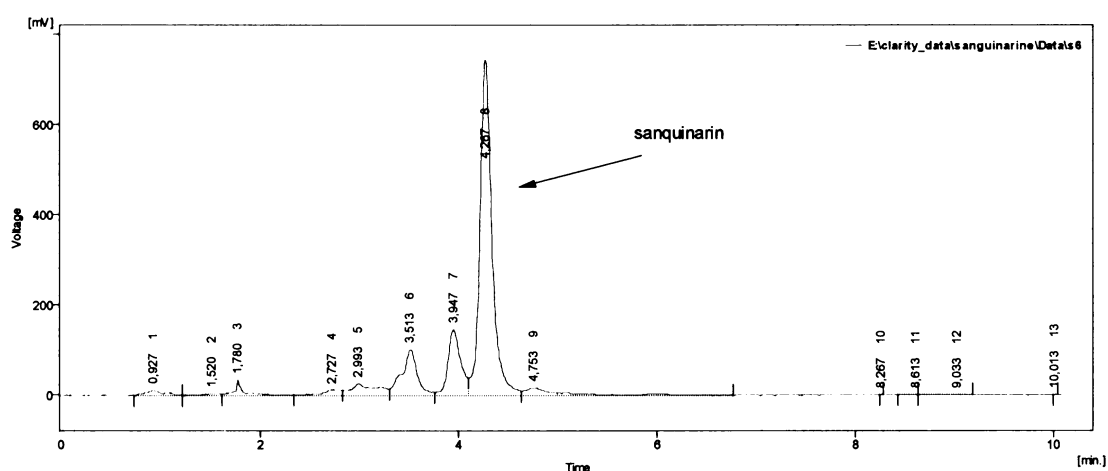
se zdála být vůči reakci poměrně inertní. Přesto byly zvoleny velmi mírné podmínky a palladium na síranu barnatém jako katalyzátor místo obvyklého palladia na uhlí. Důvodem byla potenciální možnost hydrogenolýzy dioxolanových kruhů.

Analýzou „studeného“ vzorku sanguinarinu na tenké vrstvě bylo zjištěno, že již dodaná výchozí látka (připravená na spolupracujícím pracovišti LF UP v Olomouci, laboratoř. Prof. MUDr. et RNDr. V. Šimánka, Dr.Sc.) není chemicky čistá. Došlo k rozdělení na dvě zóny, z nichž jedna zůstávala za daných podmínek na startu. Analýzou extrahovaných skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že látka pohybující se v použité mobilní fázi je vlastní sanguinarin. Zbylé komponenty vzorku potom již nebyly identifikovány.

Protože se předpokládalo, že výsledný produkt po tritiaci bude kontaminován větším či menším množstvím nově vzniklých nečistot byla k tritiaci použita přímo dodaná substance. Tritiace byla provedena v ÚJV Řež na standartní tritiační aparatuře. Výsledný roztok po odstranění labilní aktivity měl objem 8,1 ml vykazoval aktivitu 264,7 MBq. Izolace [³H]sanguinarinu z reakční směsi byla provedena ve dvou fázích. Pomocí sloupcové chromatografie byla získána předčištěná frakce, která vykazovala mobilitu v daném chromatografickém systému, a ta byla následně přečištěna HPLC. Čistota vzorku byla ověřena chromatografií zahuštěných a sebraných frakcí. Důvodem pro dvoufázovou izolaci byl fakt, že nečistoty přítomné

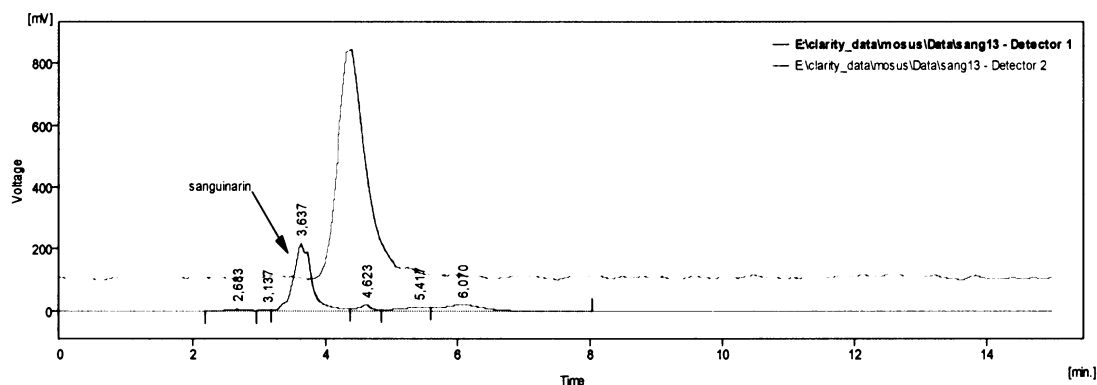
v primární reakční směsi prodlužovaly a komplikovaly HPLC separační proces a po několika nástřicích bylo nutné několikahodinové promývání kolony, aby mohly být jednotlivé separace reprodukovatelné. Sebrané frakce byly ředěny na definovaný objem a na základě UV kalibrace (HPLC) byla stanovena koncentrace látky ve vzorku, aktivita byla stanovena pomocí LSC. Z praktických důvodů byl v první fázi proveden orientační pokus s malým množstvím (0,5 ml) reakční směsi. Chromatografie na silikagelu/methanol poskytla celkem 9 frakcí v časových úsecích $t = 4$ min při rychlosti $v = 8$ kapek/min. Alikvoty jednotlivých frakcí byly měřeny LSC a bylo zjištěno, že nejvýraznější podíl aktivity se vyskytuje ve frakcích 3-6, což odpovídalo předchozím experimentům s chromatografií neaktivní substance. Spojené frakce 3-6 potom obsahovaly 28% celkem nanesené aktivity ($A = 4,66$ MBq). Z předčištěné frakce (chromatogram s UV-detekcí – obr.5) byly postupnými nástřiky na analytickou kolonu (20 μ l) získávány frakce obsahující čistý tritiováný sanguinarin.

Zbylá reakční směs z tritiace byla zahuštěna za vakua na přibližně 1,5 ml a podrobena stejné proceduře. Celkový objem spojených frakcí byl 4,4 ml. Výsledný objem vzorku byl upraven na 3 ml, z chromatografické analýzy byla stanovena koncentrace a chemická čistota vzorku (UV), stejně tak jako radiochemická čistota (HPLC scintilační detektor).



Obr.5 Chromatogram předčištěné reakční směsi z tritiace sanguinarinu (HPLC metoda A - viz materiály a metody)

Parametry získaného preparátu jsou uvedeny v následujícím přehledu, celkový protokol je součástí diplomové práce jako Příloha 1, chromatogram s UV detekcí a detekcí radioaktivity je na obrázku 6.



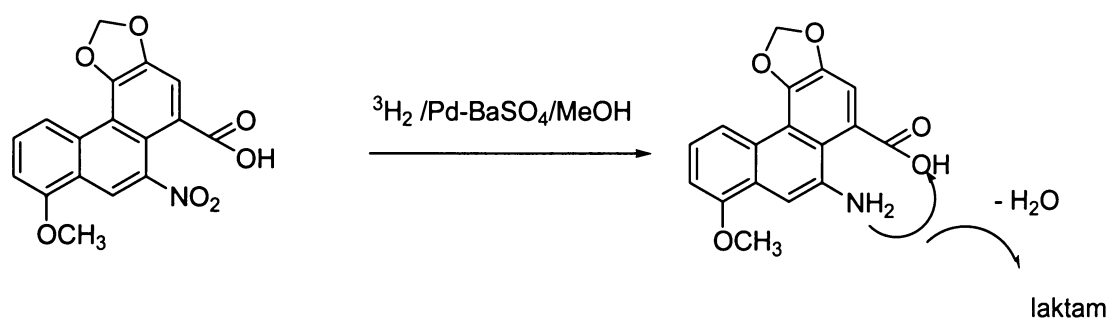
Obr.6 Chromatogram připraveného [³H]sanguinarinu (HPLC *Metoda A*, modrá - detekce UV, červená - detekce radioaktivity), posun signálů pro jednotlivé detektory odpovídá objemu spojovací kapiláry mezi detektory.

- ✓ Chemický výtěžek/metoda : izolováno 7,5% původně vnesené substance (HPLC, hmotn.bilance)
- ✓ Chemická čistota : > 95% (HPLC)
- ✓ Radiochemická čistota : > 95% (HPLC – detekce radioaktivity)
- ✓ Měrná aktivita produktu : 276 MBq/μmol
- ✓ Celková aktivita produktu : 282 MBq
- ✓ Celkový objem vzorku : 3 ml
- ✓ Rozpouštědlo : H₂O, octan amonný max. 32 mg/ml
- ✓ Hmotnost : 0,375 mg (UV kalibrace)
- ✓ Koncentrace : 0,125 mg/ml
- ✓ Objemová aktivita : 94 MBq/ml

V současné době je připravený tritiováný sanguinarin využíván v experimentu *in vivo*, kdy byl podáván laboratorním potkanům pro sledování jeho biodistribuce v organismu tohoto modelového organismu. Experimenty, které však ještě nejsou finalizovány, jsou prováděny na spolupracujícím pracovišti LF UP v Olomouci (laboratoř. Prof. MUDr. et RNDr. V. Šimánka, Dr.Sc.).

5.2 Aristolochová kyselina I

V případě aristolochové kyseliny I je metoda přímé tritiacce prakticky nepoužitelná. Struktura obsahuje nitroskupinu, která je za podmínek tritiacce redukována na aminoskupinu, která interaguje s volným karboxylem za vzniku aristolaktamu. Této reakci napomáhá i sterické uspořádání, které rezultuje v tvorbu šestičleného laktamového kruhu (Obr.7)

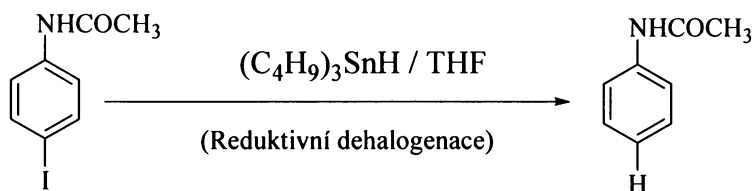


Obr.7 Schéma spontánní tvorby aristolaktamu

Pro uvedenou látku bylo tedy nutné navrhnout a otestovat metodu značení, která by nemodifikovala uvedenou strukturu a zároveň splňovala požadavky kladené na radiochemické syntézy, jak z hlediska provedení, tak i z hlediska bezpečné manipulace se zdroji ionizujícího záření. Současně by bylo vhodné, aby metoda byla širěji použitelná na látky, obsahující redukovatelné fragmenty skeletu. Jedním z možných postupů se ukázalo použití reduktivní dehalogenace aryljodidů vhodným hydridovým činidlem. Klasické metody redukční dehalogenace sice poskytují dobré výtěžky, nicméně používají taková činidla, která neřeší problém redukce dalších funkčních skupin. Již dříve byla testována možnost použití silanů⁽⁴⁰⁾. Atraktivnějším se zdálo použití stannanů, které by mohly splňovat výše uvedené požadavky.

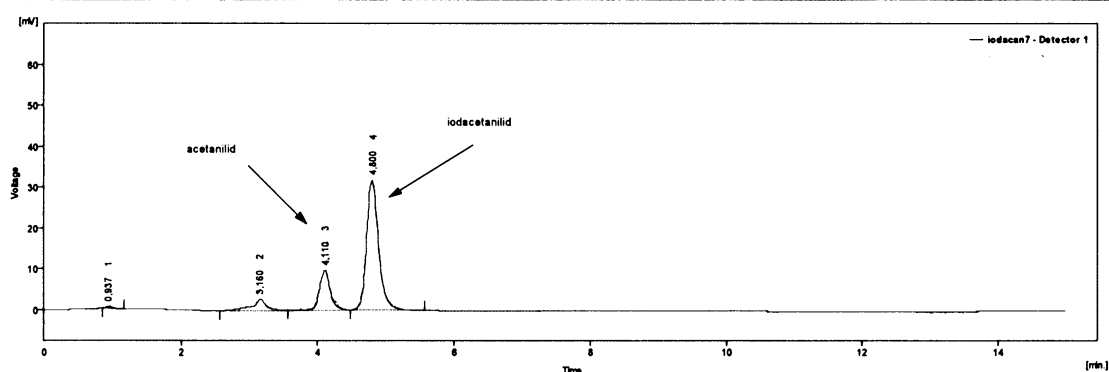
Samotná příprava arylhalogenidů, konkrétně aryljodidů, není principiálně problémem, protože kromě klasických metod jsou k dispozici i metody radiojodace, které dovolují vnášet jod na aromatické jádro chloraminovou, jodogenovou nebo enzymatickou metodou. Jejich použití v neaktivním provedení nic nebrání.

Reakce byla testována na modelovém substrátu p-jodacetanilidu, který redukční dehalogenací přechází na acetanilid (Obr.8). Pro testování byl použit komerčně dodávaný tributylstannan



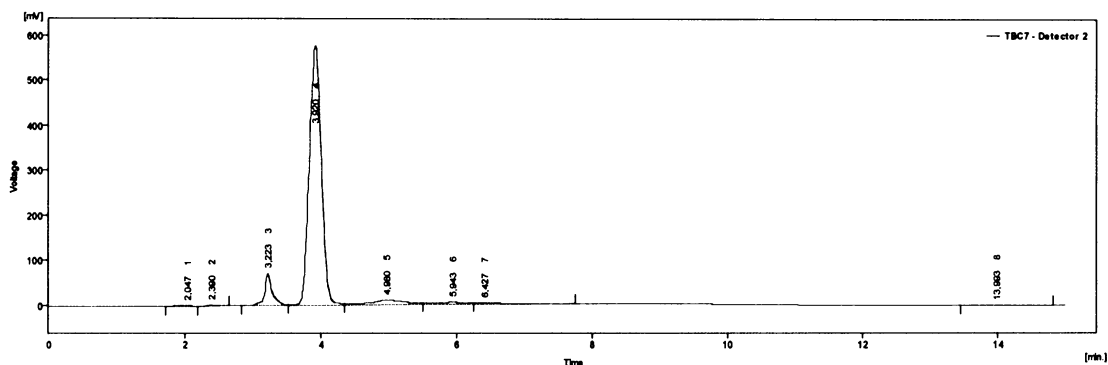
Obr.8 Schéma modelové reakce

V uvedeném reakčním systému bylo nutné nejdříve nalézt podmínky pro provedení vlastní reakce. Reakce byla testována za různých teplot, s rozdílným poměrem substrát/reagent a v přítomnosti různých katalyzátorů. Stupeň konverze výchozí látky byl analyzován pomocí HPLC (*Metoda B*, obr. 9)



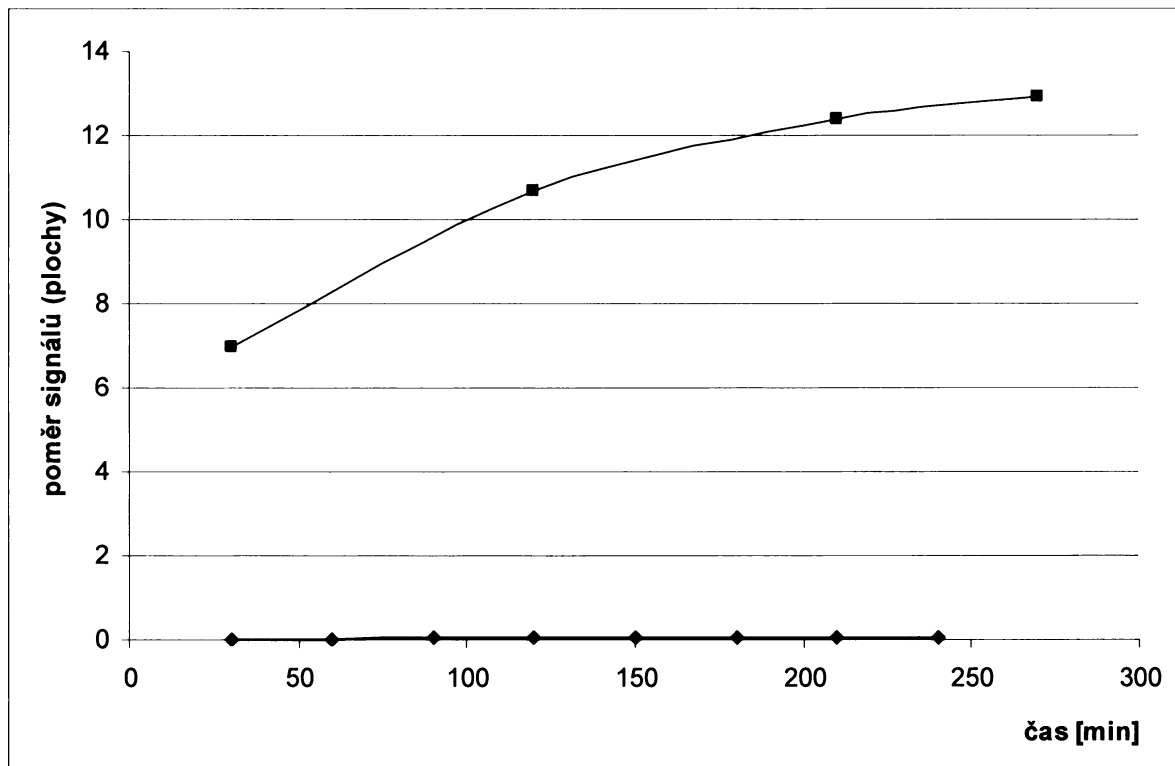
Obr.9 HPLC separace p-jodacetanilidu a acetanilidu - *Metoda B*, (modrá pro $\lambda = 254$ nm, červená pro $\lambda = 270$ nm)

Při provedení reakce za laboratorní teploty a zhruba trojnásobném molárním přebytku tributylstannanu probíhá reakce velmi neochotně. Sledovaný poměr signálů výchozí látky a produktu nepřesahuje jednotky procent. Zvýšení reakční teploty na 50°C rovněž nevedlo k výraznému nárůstu množství produktu v reakční směsi. Přestože sledovaný poměr ploch signálů se se vzrůstajícím časem zvyšuje, výsledná konverze výchozí látky nepřesahuje 10 %. (Obr.10)



Obr.10 Chromatogram reakční směsi p-jodacetanilidu s tributylstannanem po 4 hodinách reakce při 50 °C, HPLC - *Metoda B*; signál 3,9 min odpovídá výchozímu p-jodacetanilidu, signál 3,22 min je produkt - acetanilid (8 % plochy vzhledem k výchozí látce).

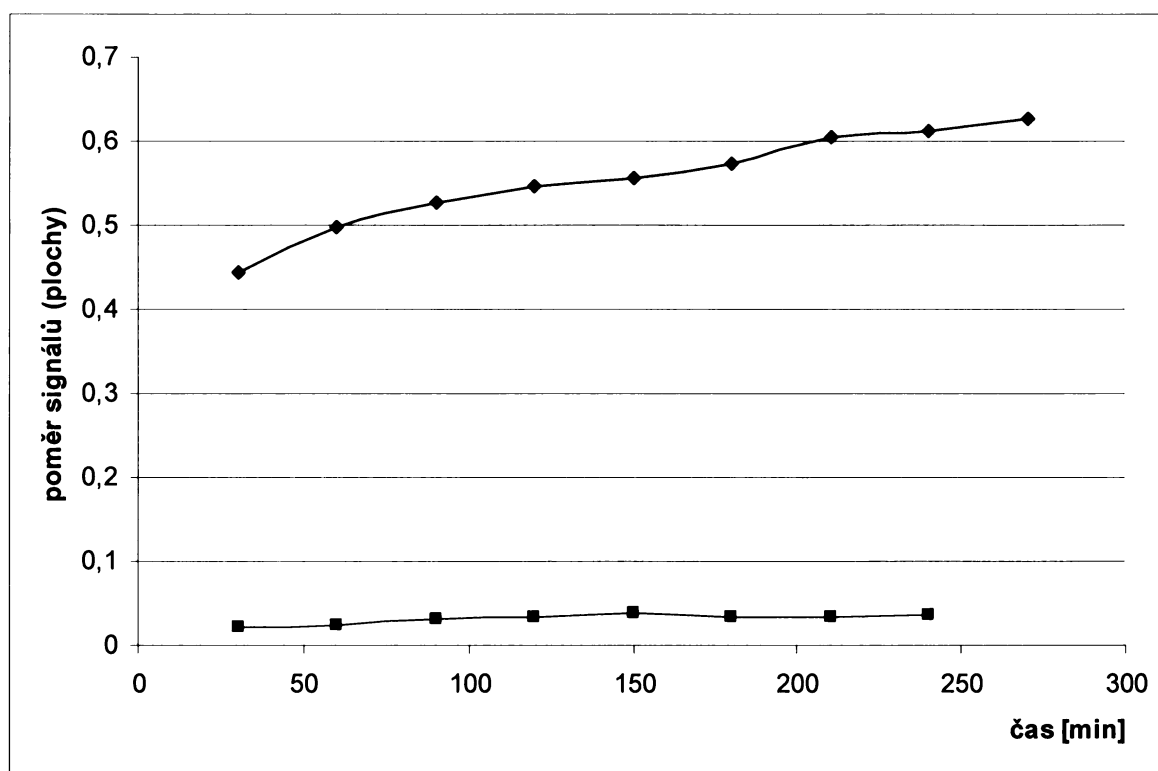
Zvýšení molárního poměru tributylstannanu k substrátu na 30:1 vedlo k výraznému zlepšení výtěžků, po 4 hodinách reakce byl chromatografickým měřením stanoven výtěžek 93 %. Identita vzniklé substance byla ověřena hmotnostní analýzou vzorku mobilní fáze odpovídající elučnímu objemu standardní substance. Časový průběh reakce ukazuje Obr. 11



Obr.11 Srovnání průběhu reakce tributylstannanu s p-jodacetanilidem v THF při 50°C. Modrá – 3x molární přebytek stannanu, červená – 10x molární přebytek stannanu. Analýza HPLC (*Metoda B*), vynášen poměr ploch pod křivkou IAA /AA

Vzhledem k tomu, že předpokládaný účel zkoumané reakce je tritiace odpovídajícím stannanem, nelze předpokládat výraznou možnost ovlivnění průběhu reakce nadbytkem tritiovaného stannanu, který bude muset být použit bez izolace v reakčním systému, ve kterém bude připraven. Použití teploty rovněž nevede k rozumnému zvýšení výtěžku. Jedinou možností, jak optimalizovat daný systém je použití vhodného katalyzátoru. Jako katalyzátory byly testovány 10% Pd/C a trifenyfosfinové komplexy vybraných přechodných kovů.

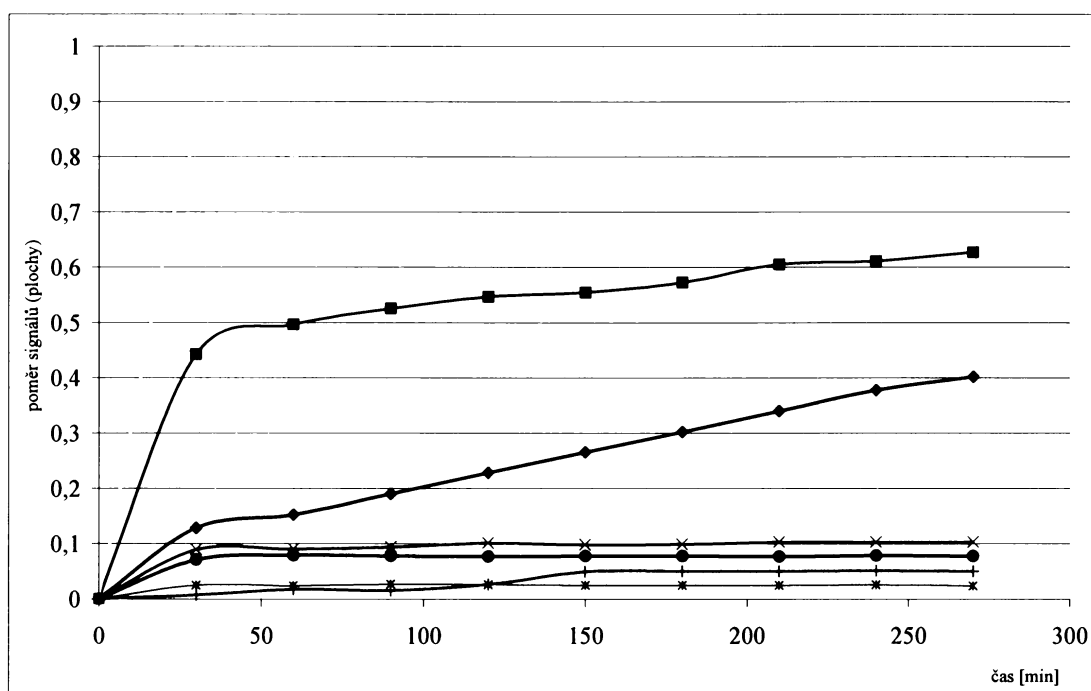
Reakce byly prováděny pouze s trojnásobným molárním přebytkem tributylstannanu. V této souvislosti je potřeba vzít v úvahu, že se jedná o reaktivní hydrid, který je rozkládán vlhkostí jak při manipulaci, tak třeba i zbytkovou vlhkostí reakčního rozpouštědla, či vlhkostí, kterou získá při dávkování. Tyto technické problémy lze sice eliminovat, nicméně vzhledem k předpokládanému použití metodiky pro radiochemickou syntézu byla dána přednost simulaci radiochemických syntetických postupů a tedy předpokládaného pozdějšího reálného provedení, před izolací od vlhkosti.



Obr.12 Srovnání průběhu reakce tributylstannanu s p-jodacetanilidem v THF při 50 °C bez přídavku katalyzátoru (červená) a s přídavkem komplexu bis(trifenyfosfino)dichlorpalladnatého. Analýza HPLC(Metoda B), vynášen poměr ploch pod křivkou pro vznikající IAA k AA.

Z grafického znázornění je zřejmé, že katalyzovaná reakce dosahuje uspokojivých výtěžků. Již po 30 minutách je chromatografický výtěžek okolo 30 %, s prodloužením reakční doby se ještě zvyšuje ke 40 %. Takovýto experimentální systém už umožňuje provedení syntézy v tritiovaném provedení s dostatečnou účinností.

Srovnání účinnosti použitých katalyzátorů je znázorněno na obr. 13



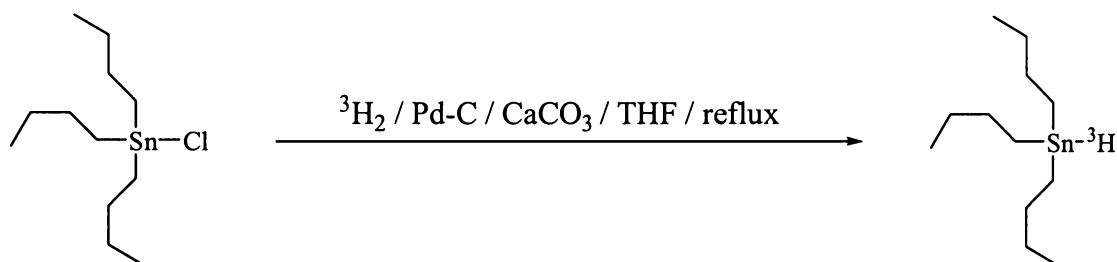
Obr.13 Srovnání účinnosti různých katalyzátorů pro reduktivní dehalogenaci p-jodacetanilidu (reakce v THF, 50°C, 0,5 mg katalyzátoru, molární poměr substrát/reagent 1:3, na osu y vynášen poměr ploch chromatografických signálů produktu/výchozí látky).

(10% Pd/C (modrá), [PdCl₂(Ph₃P)₂] (růžová), [NiCl₂(Ph₃P)₂] (žlutá), [PtCl₂(Ph₃P)₂] (červená), [RuCl₂(Ph₃P)₃] (fialová), [RhCl(Ph₃P)₃] (hnědá) [CuCl(Ph₃P)₃] (zelená))

Z naměřených výsledků je zřejmé, že nejaktivnějším katalyzátorem je komplex niklu, který poskytuje jak dobré výtěžky, tak i přijatelnou reakční dobu. Použitelným se zdá i komplex palladia nebo použití Pd/C, které je přítomno přímo v reakční směsi po tritiaci chlorotributylstannanu. Jejich použití by však vyžadovalo podstatně delší reakční doby. Pozitivním je však zjištění, že nedokonalé odstranění Pd/C z reakční směsi po přípravě tritidového činidla neovlivní významně reakci katalyzovanou komplexem

niklu při krátké reakční době dostatečné pro reakci s tímto katalyzátorem, a pokud ano, tak v pozitivním smyslu.

Příprava [³H]tributylstannanu z chlorotributylstannanu (Obr.14) byla experimentálně navržena tak, aby byla proveditelná v standartní tritiační aparatuře.



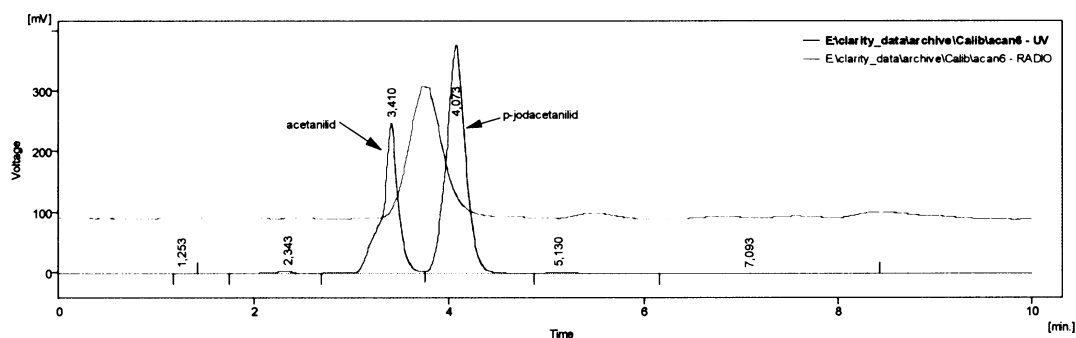
Obr.14 Příprava [³H]tributylstannanu z chlorotributylstannanu

V první fázi byla reakce prováděna v neaktivním provedení s plynným vodíkem a k analytickému vyhodnocení byla použita reakce p-jodacetanilidem, kde bylo analytické vyhodnocení poměrně jednoduché a zároveň simulovalo následné radiochemické využití. Byly prováděny i pokusy s deuterací, kdy deuterium bylo získáváno rozkladem deuterium oxidu sodíkem. Výsledky však nebyly jednoznačně interpretovatelné, a proto byly vyhodnoceny pouze experimenty s vodíkem a následně s tritiem.

Katalyzovaná redukční reakce chlorotributylstannanu s plynným vodíkem v THF a uhličitánem vápenatým jako bází se ukázala být efektivní za podmínek zahřívání na 50°C a reakční době 4 hod. Výtěžek reakce v tomto případě opět nebyl stanovován přímo, jako optimum byly vybrány podmínky poskytující nejvýhodnější poměr acetanilidu k p-jodacetanilidu ve sprzęžené reakci použité k detekci vznikajícího hydridu. Tritiační reakce byla provedena za stejných podmínek jako reakce s plynným vodíkem, kdy byl získán roztok reagentu v THF o celkové aktivitě 2,6 GBq/3 ml. Palladiový katalyzátor nebyl ze systému odstraňován, pro vlastní další práci byl opatrně odpipetován roztok nad usazeným katalyzátorem. Z experimentů s katalyzátory při dehalogenační reakci vyplývá, že zbytková přítomnost Pd/C neovlivňuje významně průběh dalších reakcí a může mít maximálně mírně pozitivní vliv.

Modelový experiment s p-jodacetanilidem prokázal schopnost připraveného tritiačního činidla dehydrohalogenovat uvedený substrát.

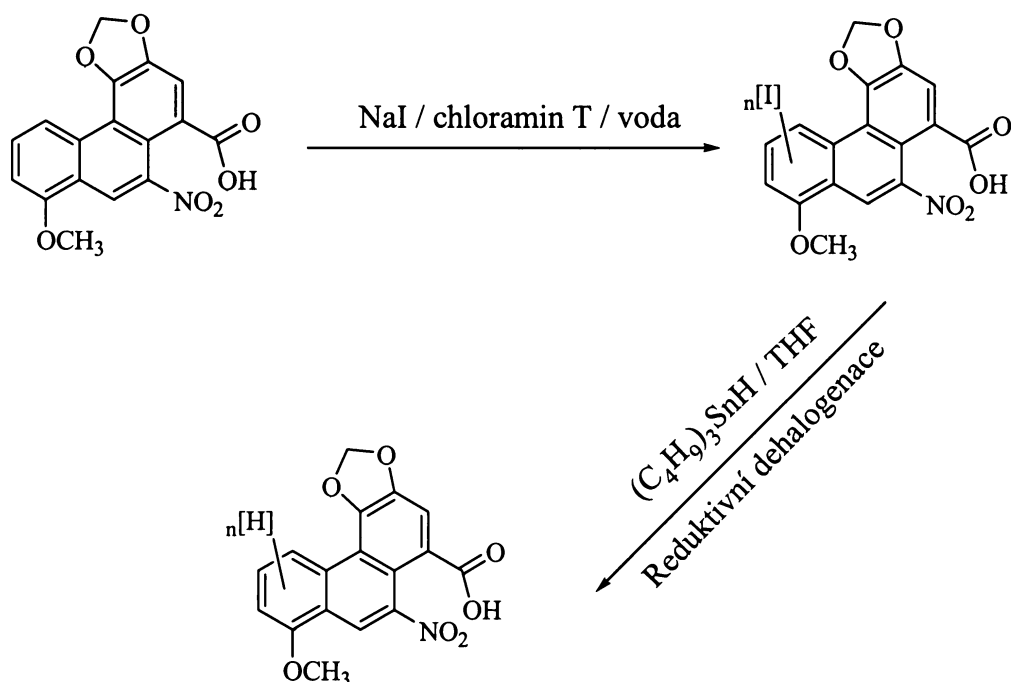
Chromatogram reakční směsi je na obrázku 15.



Obr.15 Chromatogram reakční směsi při reakci p-jodacetanilidu s reakční směsí z přípravy [^3H]tributylstannanu (*Metoda B*, modrá - detekce UV při $\lambda = 254$ nm, červená - detekce radioaktivity → posun píku odpovídá objemu spojovací kapiláry mezi detektory)

Dále byla testována stabilita připraveného stannanu s cílem ověřit, jak dlouho bude surová reakční směs aktivní pro reduktivní dehalogenaci. Skladování probíhalo za standardních podmínek - uzavřená reakční baňka, ve které byla provedena reakce, běžná teplota v lednici. Testy prokázaly, že i po třech měsících skladování je reakční směs z tritiační reakce schopna dehalogenovat modelový substrát, jak bylo prokázáno měřením radioaktivity. Výtěžky jsou sice nižší, ale vzhledem k vysoké radioaktivitě činidla přesto dostatečné pro tritiaci substrátů použitelných především pro stopovací experimenty.

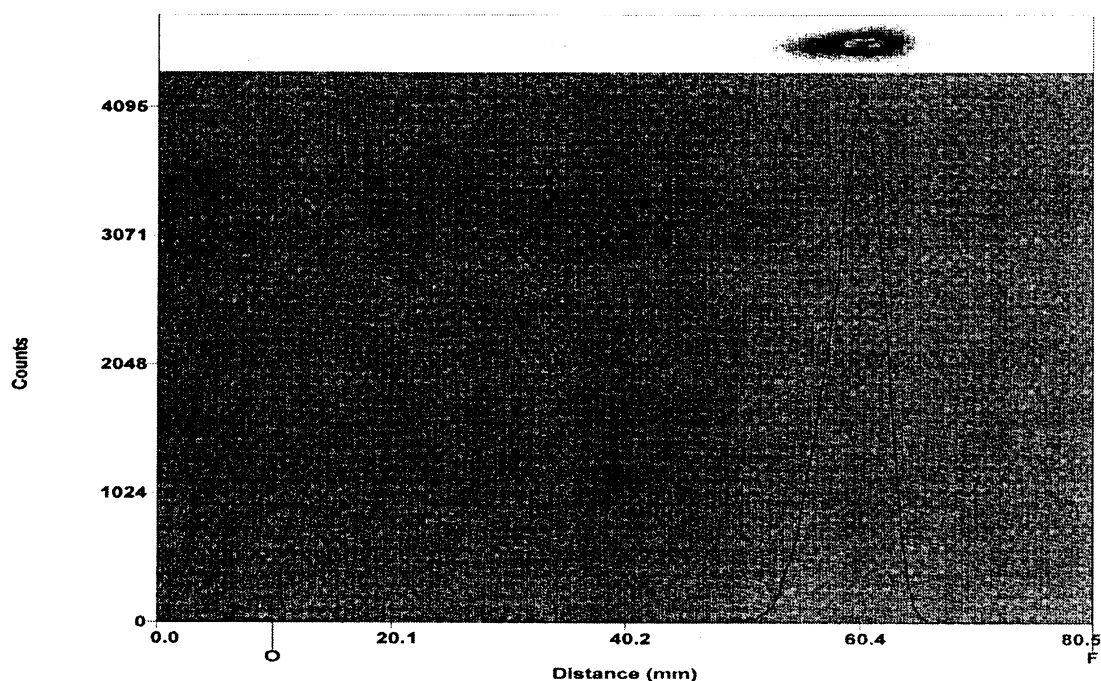
Příprava [³H]aristolochové kyseliny I, jak vyplývá z předchozího, sleduje schéma uvedené na obr. 16



Obr.16 Návrh syntetického postupu pro modifikaci molekuly aristolochové kyseliny I tritiem.

Pro první krok - přípravu jodderivátu - byla zvolena metoda jodace chloraminovou metodou. Výhodou je rychlost přípravy a především to, že metoda je použitelná v mikrokvantech, což ji preferuje právě pro substráty, které jsou dostupné pouze v malých množstvích. Pro ověření inkorporace jodu do molekuly byla reakce provedena s přidavkem ¹³¹I, která prokázala úspěšnost reakce.

Na obrázku 17 je autoradiogram TLC analýzy izolovaného produktu a distribuce radioaktivity podle dráhy chromatogramu. Poloha radioaktivní skvrny odpovídá R_F aristolochové kyseliny I. Rozdělení jodovaného produktu od původní substance se v TLC systému ukázalo jako nereálné.



Obr.17 Autoradiogram (nahore) a distribuce radioaktivity (dole) v izolovaném produktu po jodaci aristolochové kyseliny I.

Z TLC analýz je zřejmé, že izolovaný produkt má v sobě inkorporovaný jod. Vzhledem k obtížím separace výchozí látky a produktu může být sice chromatografická skvrna superpozicí jodované a nejodované látky, což však pro daný účel nevádí, pouze může snížit měrnou aktivitu. V každém případě není v izolovaném produktu další jodovaná látka nebo produkt destrukce molekuly.

Reakce jodaristolochové kyseliny I s tritiační směsí obsahující $[^3\text{H}]$ tributylstannan byla provedena v tetrahydrofuranu za katalýzy $\text{NiCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2$, který se v testovacích experimentech ukázal jako nejaktivnější, a za podmínek ověřených pro úspěšnou reduktivní dehalogenaci p-jodacetanilidu. Reakční směs byla analyzována HPLC. Při analýze s detekcí radioaktivity se zjistilo, že reakční směs obsahuje majoritní podíl aktivity s krátkým retenčním časem, který neodpovídá retenčnímu času aristolochové kyseliny I. Strukturní charakterizace této sloučeniny (aktivity) nebyla, vzhledem k časovým důvodům vypracování diplomové práce, prováděna. V oblasti jejího elučního objemu se vyskytl pouze malý signál aktivity, který byl vyhodnocen na přibližně 1 % celkové

aktivity analyzovaného vzorku. Sebraná frakce s UV odezvou odpovídající aristolochové kyselině I vykazovala aktivitu $1.57 \cdot 10^6$ DPM.

Protože nebylo možné stanovit přesně koncentraci ve finálním vzorku byl výpočet získané měrné aktivity proveden pouze orientačně na základě hmotnosti vnesené látky do jodační reakce a odebraného alikvotu pro analýzu (0,055 μg), které neodporuje získaným chromatografickým výsledkům a předchozím kalibracím. Měrná aktivita produktu je potom $1,6 \cdot 10^5$ MBq/mmol. V rámci tritiace aristolochové kyseliny I tedy byla získána tritiem značená látka, která vykazuje identické chromatografické chování a výše uvedenou přibližnou specifickou aktivitu. Izolované substance bylo pouze nepatrné množství, které bylo spotřebováno k analytickým účelům. Jako taková však byla navržena, vypracována a ověřena metoda, která vede úspěšně k tritiem modifikované molekule kyseliny aristolochové I.

6 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na přípravu tritiem modifikovaných biomolekul se složitou strukturou a funkčními skupinami atakovatelnými klasickou výměnnou tritiační reakcí (biochemicky účinných látek sanguinarinu a aristolochové kyseliny I). Přestože u molekuly sanquinarinu vedla katalytická tritiace k částečnému znehodnocení vnesené substance, bylo možné tritiováný analog izolovat s dostatečnou aktivitou a následně charakterizovat z hlediska značené sloučeniny. U aristolochové kyseliny I vede tritiace k předpokládanému aristolaktamu a reakce je prakticky kompletní, izolace zbytkové koncentrace nedávala smysl. Byla proto vypracována metoda založená na reduktivní dehalogenaci arylhalogenidů, která je použitelná pro uvedený substrát a obecně pro řadu dalších substrátů obsahujících některé redukovatelné funkční skupiny. Metoda byla testována na modelovém systému p-jodacetanilid/acetanilid s použitím široké škály reakčních podmínek. Vlastní aristolochová kyselina I byla úspěšně jodována a následně dehalogenována na produkt chromatograficky odpovídající aristolochové kyselině I a vykazující radioaktivitu.

Obě značené substance definované v cíli projektu byly připraveny, stejně tak jako byla úspěšně provedena studie redukční dehalogenace arylhalogenidů v neaktivní i radioaktivní formě.

Byla tak vypracována metodika vhodná pro vnášení tritia do některých citlivých biomolekul.

7 Seznam použité literatury

- [1] Markoš, A.: Povstání živého tvaru, Vesmír, Praha, (1997)
- [2] Manson, M.M. a Benford, D.J.: Factors influencing the carcinogenicity of food chemicals, Toxicology 134, 93, (1999)
- [3] Stiborová, M. a Mikšanová, M.: Živa 4, 146, (1999)
- [4] Rozsypal, S.: Úvod do molekulární biologie, Brno (1997)
- [5] Holý, A.: Virostatika a kancerostatika, ÚOCHB, Praha (1999)
- [6] Stiborová, M.: Mechanismus karcinogeneze, Přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2005)
- [7] Turek, B., Hrubý, S. a Černá, M.: Nutriční toxikologie, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 18 (1994)
- [8] Feinberg, A. P., Ohlsson, R., Henikoff, S.: The epigenetic progenitor origin of human cancer, Nature Reviews Genetics 7, 21 (2006)
- [9] Menn, J.J.: Environ. Health Persp., 27, 113 (1987)
- [10] Škárka, B. a Ferenčík, M.: Biochémiá, Alfa Bratislava, SNTL Praha, (1987)
- [11] Tomalis, L., Aitio, A., Wilbourn., J. a Shuker, L.: Jpn. J. Cancer Res. 80, 795, (1989)
- [12] Stiborová, M.: Xenobiochemie. Přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2005)
- [13] Kasper, C.B., Henton, D.C., Foureman, G.L., Curtis, J.F. a Hughes, M.F.: Enzymatic Basis of Detoxication II, Academic Press, New York, (1980)
- [14] Stiborová, M., Schmeiser, H.H. a Frei, E.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 857 (1997)
- [15] Janča, J. a Zentrich, J.A.: Herbář léčivých rostlin, Eminent (2000)
- [16] Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M. a Stiborová, M.: Carcinogenesis 18, 1055 (1997)
- [17] Stiborová, M., Fernando, R.C., Schmeiser, H.H., Frei, E., Pfau, W. a Wiessler, M.: Carcinogenesis 15, 1187 (1994)

- [18] Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J. a Šimánek, V.: Kvartérní izochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vivo a in vitro, Chem. Listy 100, 30, (2006)
- [19] Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: Chem. Listy 94, 186, (2000)
- [20] Arlt, V., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: Mutagenesis 17, 265, (2002)
- [21] Stiborová, M., Patočka, J., Frei, E., Schmeiser, H.H.: Chem. Listy 99, 782, (2005)
- [22] Murray, A., Williams D. L.: Organic Synthesis with Isotopes, Interscience Publ. Inc., New York, (1958)
- [23] Lešetický L.: Izotopově značené sloučeniny, Habilitační spis, ČVUT Praha, (2000)
- [24] Majer V.: Základy jaderné chemie, SNTL/ALFA, Praha (1981)
- [25] Lind S.C., Radiation chemistry, Reinhold, New York, (1961)
- [26] Shu, A.Y.L., Saunders, D., Levinson, S.H., Landvatter, S.W., Mahoney, A., Senderoff, S.G., Mack, J.F., Heys, J.R.: J. Labelled. Compd. Radiopharm, 42, 797, (1999)
- [27] Nielsen, A.T., Atkins, R.L, Norris, W.P.: J. Org. Chem., 45, 2341, (1980)
- [28] Sakaue, S., Tsubakino, T., Nishiyama, Y., Ishii, Y.: J. Org. Chem., 58, 3633, (1993)
- [29] Gilbert, K.E., Borden, W.T.: J. Org. Chem., 44, 659, (1979)
- [30] Bunnett, J. F., Wamser, C.C.: J. Amer. Chem. Soc., 89, 6712, (1967)
- [31] Wittig, G., Rentzea, C. N., Rentzea, M.: Justus Liebigs Ann. Chem., 744, 8, (1971)
- [32] Krishnamurthy, S., Brown, H.: J. Org. Chem., 47, 276, (1982)
- [33] Tsujimoto, K., Tasak, S., Ohashi, M.: J. Chem. Soc. Chem. Commun., 758, (1975)
- [34] Brown, H.C., Krishnamurthy, S.: J. Org. Chem., 54, 3918, (1989)
- [35] Narisada, M., Horibe, I., Watanabe, F., Takeda, K.: J. Org. Chem., 54, 5308, (1989)
- [36] Viciu, M.S., Grasa, G.A., Nolan, S.P.: Organometallics, 20, 3607, (2001)
- [37] Navarro, O., Kaur, H., Mahjoor, P., Nolan, S.P.: J. Org. Chem., 69, 3173, (2004)

- [38] Desmartes, Ch., Kuhl, S., Schneider, R., Fort, Y.: *Organometallics*, 21, 1554, (2002)
- [39] Marques, C.A., Selva, M., Tundo, P.: *J. Org. Chem.*, 59, 3830, (1994)
- [40] Jelínek, D.: *Diplomová práce, PřF UK v Praze*, (1984)

Použité zkratky

AA	acetanilid
AAI	kyselina aristolochová I
COD	1,5-cyklooktadien
COX	cyklooxygenáza
CY	cyklohexyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPM	rozpady za minutu (desintegrations per minute)
DPPE	bis-1,2-difenylfosfinoethan
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAA	p - jodacetanilid
LSC	kapalná scintilace
LYS	lysin
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
ONC	onkogeny
PY	pyridin
QBA	kvartérní benzocfenanthridinové alkaloidy
RNA	ribonukleová kyselina
SA	sanguinarin
TAG	tumorový glykoprotein
THF	tetrohydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TSG	tumor supresorové geny
UV	ultrafialové záření

Přílohy

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy V Praze

Katedra organické a jaderné chemie

Protokol o přípravě izotopicky značené sloučeniny

Požadovaná sloučenina: [³H]sanguinarin

Izotop: ³H

Výchozí látka: Sanguinarin

Dodavatel: Kat. biochemie PřF UK

Reakce: tritiace plynem v MeOH, katalyzátor Pd/BaSO₄, odstranění labilní aktivity, izolace HPLC (Supelcosil C-18, acetonitril/acetátový pufr (50 mM octan amonný +20 ml kys. octové/l)) 40/60 (v/v)

Postup dle: originální

Reakce provedena dne: 4.12. 2005 - 30. 3. 2006

Chemický výtěžek/metoda: izolováno 7,5 % původně vnesené substance
(HPLC, hmotnostní bilance)

Radiochemický výtěžek: nestanoveno

Chemická čistota/metoda: > 95 % (HPLC)

Radiochemická čistota: > 95 % (HPLC – detekce radioaktivity)

Měrná aktivita produktu: 276 MBq/□mol

Celková aktivita v produktu: 282 MBq

Odpady: Kapalný + pevný odpad uložen ve skladu odpadů PřF UK v Praze ,
likvidace dle platných předpisů

Adjustace látky pro expedici:

Označení vzorku: ***3H Sanguinarin***

Balení: lékovka, gumové septum

Celkový objem vzorku: 3 ml

Rozpouštědlo: voda, octan amonný max. 32 mg/ml

Hmotnost:

Koncentrace: 0,125 mg/ml

Objemová aktivita: 94 MBq/ml

Datum měření aktivity: 30.3.2006

Skladovací podmínky: 4 °C

Poznámky:

Expedováno dne : 30.3.2006

Připravil: Martina Hřebíčková, Ing. Šárka Pšondrová, Doc. Ing.
Stanislav Smrček, CSc.